

# Формирование сигнала двухфотонной флуоресцентной микроскопии в условиях сильного рассеяния: теоретическое и численное моделирование

Е.А.Сергеева, А.Р.Катичев, М.Ю.Кириллин

*В рамках теории переноса излучения и с помощью моделирования методом Монте-Карло проанализировано влияние рассеяния в среде и размеров детектирующей диафрагмы на формирование флуоресцентного сигнала в стандартных установках двухфотонной флуоресцентной микроскопии (ДФМ). Теоретический анализ базируется на малоугловом диффузионном приближении уравнения переноса излучения, адаптированном для расчета распространения сфокусированного ИК излучения в средах, близких по оптическим свойствам к биологическим тканям. Точность модели оценена с помощью сравнения рассчитанной интенсивности накачки в сильно рассеивающей среде с результатами численного моделирования методом Монте-Карло. Для Монте-Карло-моделирования острого фокусированного гауссова пучка использован квазилучевой подход, позволивший корректно учесть конечный размер перетяжки и форму пучка. Показано, что в комбинированных установках конфокальной и двухфотонной флуоресцентной сканирующей микроскопии, не оснащенных внешним «недесканирующим» детектором, рассеяние существенно сказывается как на эффективности нелинейного возбуждения в глубине среды, так и на собирающей способности системы. В таких установках скорость уменьшения полезного сигнала ДФМ с глубиной оказывается в 1.5–2 раза выше, чем в установках, оснащенных «недесканирующим» детектором.*

**Ключевые слова:** двухфотонная флуоресцентная микроскопия, многократное рассеяние, теория переноса излучения, малоугловое диффузионное приближение, моделирование методом Монте-Карло, сфокусированный гауссов пучок.

## 1. Введение

Среди методов биомедицинской оптической диагностики, в которых используется излучение ближнего ИК диапазона ( $\lambda_{\text{ex}} = 700\text{--}1000$  нм), двухфотонная флуоресцентная микроскопия (ДФМ) выделяется уникальным сочетанием субмикронного пространственного разрешения с высоким контрастом получаемых изображений и возможностью визуализации структуры биотканей на глубинах вплоть до 1 мм [1]. Основные применения ДФМ – наблюдение сигналов коллективной или индивидуальной активности нейронов мозга лабораторных животных *in vitro* и *in vivo* [2], а также трехмерная визуализация неокрашенных покровных тканей *in vivo* [3]. Теоретически предсказанная предельная глубина наблюдения методом ДФМ ограничена эффектами многократного рассеяния [4, 5], однако для ее достижения на практике необходимо максимизировать эффективность возбуждения и детектирования флуоресценции. Первая задача может быть решена путем использования флуорофоров с пиком двухфотонного возбуждения вблизи  $\lambda_{\text{ex}} = 1000$  нм\*, одновременно обладающих большим сечением поглощения и устойчивостью к фотовыцветанию. В настоящее время этим требованиям удовлетворяют квантовые точки [6], однако их применение в экспериментах *in vivo* требует дополнитель-

ных исследований по проблеме их накопления, выведения и токсичности. Более приемлемыми с точки зрения безопасности и функциональности считаются цветные белки, флуоресцирующие в видимом диапазоне при возбуждении в области 850–1000 нм [2], но их сечение двухфотонного поглощения на два порядка ниже, чем у квантовых точек. В такой ситуации актуальной становится задача эффективного детектирования флуоресцентного сигнала, сопряженная с оптимизацией собирающей способности системы формирования изображения.

Наибольшей собирающей способностью характеризуются системы лазерной сканирующей микроскопии (ЛСМ), оснащенные так называемым недесканирующим детектором, который регистрирует флуоресцентный сигнал максимально близко к выходу объектива [7]. В то же время некоторые ЛСМ-установки, в частности комбинированные системы конфокальной и двухфотонной флуоресцентной микроскопии, оснащены универсальным конфокальным детектором с диафрагмой, величина которой регулируется в широких пределах [8]. Как и при формировании конфокального изображения, сигнал двухфотонно возбуждаемой флуоресценции (ДФФ) в таких системах «десканируется» (т.е. проходит в обратном направлении через те же сканирующие оптические элементы, что и зондирующий пучок), но для его регистрации диафрагма детектора открывается на максимальную величину. При визуализации прозрачных объектов наличие конфокальной диафрагмы не сказывается на собирающей способности комбинированной ЛСМ-системы, однако при наличии рассеяния эффективность регистрации ДВФ снижается [9]. Известно, что это приводит к уменьшению диапазона рабочих глубин таких систем, работающих в многофотонном режиме, но количественные оценки данного эффекта в литературе отсутствуют.

\* Несмотря на более высокий показатель поглощения воды, глубина проникновения в биоткань излучения на этой длине волны выше, чем для излучения диапазона 700–800 нм.

Е.А.Сергеева, А.Р.Катичев, М.Ю.Кириллин. Институт прикладной физики РАН, Россия, 603950 Н. Новгород, ул. Ульянова, 46; e-mail: sea@ufp.appl.sci-nnov.ru

Уменьшение собирающей способности в рассеивающих средах с глубиной изучено в основном экспериментально [7, 9, 10] или с помощью численного моделирования методом Монте-Карло (МК) [10–12]. Теоретическая оценка этого эффекта была выполнена в работе [12] в рамках диффузионного приближения теории переноса излучения. Однако в биотканях в диапазоне рабочих глубин метода ДФМ доминирует малоугловое, а не диффузное рассеяние. В настоящей работе предлагается усовершенствованная аналитическая модель для описания сигнала ДВФ, регистрируемого из рассеивающей среды двумя типами приемников: недесканирующим (НДС) и десканирующим, оснащенный регулируемой по величине конфокальной диафрагмой (ДСКД). Предлагаемая модель основана на расчете светового поля в рассеивающей среде в рамках малоуглового диффузионного приближения для уравнения переноса излучения. Корректность разработанной модели подтверждается результатами МК-моделирования сигнала флуоресценции, адаптированного с учетом поперечного профиля интенсивности зондирующего пучка и типа приемника (НДС или ДСКД). Выполненное исследование позволило количественно сопоставить характеристики сигналов, регистрируемых системами формирования ДФМ-изображений с различными типами приемников.

## 2. Анализ двухфотонного возбуждения флуорофора в рассеивающей среде

### 2.1. Модели пучка накачки

Согласно [8, 13], число фотонов флуоресценции  $Q$ , порождаемых в объеме  $V$  в единицу времени (фот./с) в результате двухфотонного возбуждения флуорофора последовательностью коротких импульсов с длительностью  $\tau$  и частотой следования  $F$ , определяется соотношением

$$Q = \int_V q(\mathbf{r}) d\mathbf{r}, \quad q(\mathbf{r}) = \frac{\alpha \Sigma_2^* P_{\text{ex}}^2}{2\tau F} C(\mathbf{r}) I_{\text{ex}}^2(\mathbf{r}), \quad (1)$$

где  $q(\mathbf{r})$  – пространственная плотность источников двухфотонной флуоресценции;  $\alpha$  – форм-фактор импульса;  $\Sigma_2^*$  – динамическое сечение двухфотонного поглощения ( $\text{см}^4 \cdot \text{с}/\text{фот.}$ );  $P_{\text{ex}}$  – средняя мощность накачки (фот./с) на длине волны  $\lambda_{\text{ex}}$ ;  $C(\mathbf{r})$  – локальная концентрация флуорофора;  $I_{\text{ex}}(\mathbf{r})$  – распределение интенсивности (нормированной на  $P_{\text{ex}}$ ) в исследуемом объеме [5, 13]. Для двухфотонной генерации флуоресценции требуется высокая локальная мгновенная интенсивность (порядка  $10^{30}$  фот.  $\cdot \text{с}^{-1} \cdot \text{см}^{-2}$ ), поэтому пучок накачки обычно остро сфокусирован объективом с числовой апертурой  $\text{NA} > 0.6$ . В прозрачной среде интенсивность в сфокусированном пучке единичной мощности может быть описана с помощью гауссова распределения:

$$I_{\text{ex}}(\mathbf{r}) = \exp\left(-\frac{r_{\perp}^2}{a^2(z)}\right) (\pi a^2(z))^{-1}, \quad (2)$$

где

$$a^2(z) = \left(0.61 \frac{\lambda_{\text{ex}}}{\text{NA}}\right)^2 + \frac{(z - z_f)^2 \text{NA}^2}{1.5\pi^2 n^2}$$

– сечение пучка на разных глубинах  $z$  в среде с показателем преломления  $n$ ;  $z_f$  – глубина, на которой находится

перетяжка пучка. Распределение интенсивности на любой глубине удовлетворяет условию нормировки

$$\int_{\infty} I_{\text{ex}}(\mathbf{r}_{\perp}, z) d^2 r_{\perp} = 1.$$

При распространении сфокусированного гауссова пучка в биоткани его структура искажается из-за рассеяния (мы пренебрегаем линейным поглощением ИК излучения в диапазоне рабочих глубин ДФМ). Полная интенсивность в пучке накачки единичной мощности в среде с показателем рассеяния  $\mu_{\text{ex}}$  складывается из суммы нерассеянной, или баллистической ( $I_b$ ), и рассеянной ( $I_s$ ) компонент [14]:

$$I_{\text{ex}}(\mathbf{r}_{\perp}, z) = I_b(\mathbf{r}_{\perp}, z) + I_s(\mathbf{r}_{\perp}, z), \quad (3)$$

где

$$I_b(\mathbf{r}_{\perp}, z) = \exp\left(-\frac{r_{\perp}^2}{a^2(z)} - \mu_{\text{ex}} z\right) (\pi a^2(z))^{-1}.$$

Компонента  $I_s$  может быть найдена из решения уравнения переноса излучения с учетом ярко выраженной анизотропии рассеяния в биотканях (средний косинус угла однократного рассеяния  $g > 0.8$ ). В нашей предыдущей работе [5] рассматривалось решение для  $I_s$  в виде гауссова распределения [15]:

$$I_s(\mathbf{r}_{\perp}, z) = P_s(z) \exp\left(-\frac{r_{\perp}^2}{a_s^2(z)}\right) (\pi a_s^2(z))^{-1}. \quad (4)$$

Мощность  $P_s$  рассеянной компоненты интенсивности и ее сечение соответствуют интегральным характеристикам пучка произвольной формы, рассчитанным в малоугловом диффузионном приближении [15]:

$$P_s(z) = 1 - \exp(-\mu_{\text{ex}} z),$$

$$a_s^2(z) = a^2(z) + \frac{1}{3} \frac{\mu_{\text{ex}} \langle \gamma^2 \rangle z^3}{P_s(z)}. \quad (5)$$

Здесь  $\langle \gamma^2 \rangle$  – дисперсия малоугловой части фазовой функции рассеяния. Однако данное решение не учитывает того факта, что мощность источника для рассеянной составляющей интенсивности, которая определяется баллистической компонентой сфокусированного пучка, существенно зависит от глубины: вблизи фокуса количество рассеянных фотонов должно возрасти, поскольку там максимальна плотность нерассеянных фотонов. В настоящей работе мы сопоставим результаты расчета структуры  $I_s$ , полученной с помощью стандартного малоуглового диффузионного приближения, и его модификации, предложенной в работе [16], в которой источник рассеянных фотонов считается распределенным по глубине. В модифицированном малоугловом диффузионном приближении выражение для  $I_s$  имеет следующий вид:

$$I_s^*(\mathbf{r}_{\perp}, z) = \int_0^z \mu_{\text{ex}} \exp\left(-\frac{r_{\perp}^2}{S_s^*(z, z_1)} - \mu_{\text{ex}} z_1\right) (\pi S_s^*(z, z_1))^{-1} dz_1,$$

$$S_s^*(z, z_1) = a^2(z_1) + \frac{1}{3} \mu_{\text{ex}} \langle \gamma^2 \rangle (z - z_1)^3. \quad (6)$$

### 2.2. Модель фазовой функции

Для дальнейших вычислений необходимо задать модельную фазовую функцию, которая отражала бы особенности однократного рассеяния в биотканях. Традиционно в оптике биотканей используется фазовая функция Хеньи–Гринштейна [17]

$$p_{HG}(\gamma, g) = \frac{1 - g^2}{[1 + g^2 - 2g \cos \gamma]^{3/2}}, \tag{7}$$

удовлетворяющая условию нормировки

$$\frac{1}{2} \int_0^\pi p_{HG}(\gamma, g) \sin \gamma d\gamma = 1.$$

Она удобна тем, что для ее задания во всем диапазоне углов рассеяния  $\gamma$  используется единственный параметр – средний косинус угла рассеяния  $g$ . Функция Хеньи–Гринштейна действительно хорошо аппроксимирует многие реальные фазовые функции в области небольших углов, но соответствующий параметр  $g$  оказывается заметно больше фактора анизотропии, рассчитанного по измеренной фазовой функции, а сама функция (7) дает заниженное интегральное значение вероятности рассеяния в заднюю полусферу. В качестве альтернативных моделей предлагаются многокомпонентные фазовые функции [18], однако при этом возрастает и количество независимых параметров, определяющих парциальный вклад компонент и их форму. В настоящей работе мы обратимся к двухкомпонентной фазовой функции, состоящей из малоугловой и изотропной частей [5, 15]:

$$p(\gamma) = b p_1(\gamma) + (1 - b), \tag{8}$$

где в качестве компоненты  $p_1(\gamma)$  используется «заостренная» функция Хеньи–Гринштейна  $p_{HG}(\gamma, g')$ , соответствующая фактору анизотропии  $g' = (g + 1)/2$  [19]. Параметр  $b = 2g/(1 + g)$  определяется из равенства факторов анизотропии для измеренной фазовой функции и аппроксимации (8). Такая модель хорошо описывает реальные фазовые функции биотканей (рис.1) и к тому же позволяет разделить вклады рассеяния на малые и большие углы. Для биотканей с  $g > 0.7$  дисперсия угла рассеяния малоугловой функции  $p_1$  связана с фактором анизотропии

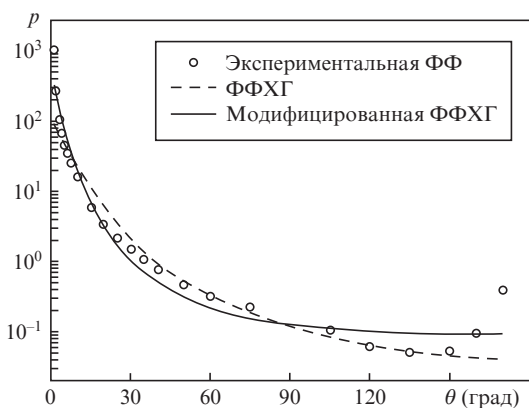


Рис.1. Фазовая функция (ФФ) рассеяния образца мозга крысы [20], характеризующаяся фактором анизотропии  $g = 0.88$ , и ее аппроксимации стандартной фазовой функцией Хеньи–Гринштейна (ФФХГ) и модифицированной ФФХГ (8) для того же значения  $g$ .

полной фазовой функции феноменологическим соотношением:

$$\langle \gamma^2 \rangle \cong 0.72(1 - g). \tag{9}$$

Модифицированная фазовая функция Хеньи–Гринштейна (8) в дальнейшем использована нами для моделирования распространения сфокусированного пучка в рассеивающей среде МК-методом и для сравнения результатов моделирования и теории.

### 2.3. МК-моделирование распространения острогофокусированного пучка накачки в рассеивающей среде

Для верификации аналитических моделей рассеяния пучка накачки нами выполнено сопоставление профилей пучка, рассчитанных по формулам стандартного ((3)–(5)) и модифицированного ((3), (6)) малоугловых диффузионных приближений, с результатами численного МК-моделирования. Последний метод широко используется в задачах биомедицинской оптики, выступая в роли «численного эксперимента», но в основном применяется для исследования распространения излучения от коллимированных источников. Моделирование острогофокусированных пучков проводится с существенными упрощениями: обычно перетяжка пучка считается точечной [21, 22]. Однако в расчете сигналов, регистрируемых различными системами оптической микроскопии, конечность радиуса перетяжки сфокусированного пучка является важным фактором, определяющим, в частности, продольное и поперечное разрешения метода. В то же время классическая реализация МК-моделирования распространения света в прозрачных и рассеивающих средах [23] предполагает, что фотоны не обладают волновыми свойствами и в свободном пространстве (либо между актами рассеяния) распространяются вдоль прямых отрезков траектории. Это делает описание дифракционной структуры гауссова пучка крайне затруднительным.

В настоящей работе при моделировании пучка, сфокусированного объективом с числовой апертурой  $NA \geq 0.6$ , мы применили квазилучевой подход [24], который в прозрачной среде обеспечивает соответствие профиля пучка формуле (2) на любой глубине. В соответствии с этим подходом первоначальное положение фотона  $(x_0, y_0)$  в плоскости выходной апертуры объектива ( $z_0 = 0$ ) определяется преобразованием Бокса–Мюллера:

$$x_0 = \frac{a(z_0)}{\sqrt{2}} \cos(2\pi \varepsilon_1) \sqrt{-2 \ln \varepsilon_2},$$

$$y_0 = \frac{a(z_0)}{\sqrt{2}} \sin(2\pi \varepsilon_1) \sqrt{-2 \ln \varepsilon_2},$$

где  $\varepsilon_1$  и  $\varepsilon_2$  – независимые случайные величины, равномерно распределенные на интервале  $(0,1)$ . Это преобразование обеспечивает гауссово распределение интенсивности в плоскости выходной апертуры объектива с шириной  $a(0) \cong z_f NA / (\pi n)$ . Первоначальное направление движения фотонов определяется вектором, соединяющим точку в плоскости  $z_0 = 0$  и точку в фокальной плоскости объектива ( $z_f$ ), определяемой тем же преобразованием:

$$x_f = \frac{a_0}{\sqrt{2}} \cos(2\pi\epsilon_3) \sqrt{-2 \ln \epsilon_4},$$

$$y_f = \frac{a_0}{\sqrt{2}} \sin(2\pi\epsilon_3) \sqrt{-2 \ln \epsilon_4},$$

где  $\epsilon_3$  и  $\epsilon_4$  – также независимые случайные величины, равномерно распределенные на интервале (0,1];  $a_0 = 0.61\lambda_{ex}/NA$  – радиус перетяжки.

Квазилучевой подход к моделированию остросфокусированного гауссова пучка позволяет с хорошей точностью воспроизводить профиль интенсивности в нерассеивающей среде, рассчитанный по аналитической формуле (рис.2). Основные параметры гауссова пучка – положение перетяжки, ее продольный и поперечный размеры – соответствуют аналитическим величинам. Это позволяет эффективно использовать данный подход для моделирования распространения сфокусированного пучка и в рассеивающей среде.

На рис.3,4 представлены аксиальные и поперечные профили сфокусированного пучка накачки в рассеивающей среде, рассчитанные с помощью МК-моделирования и из формул стандартного и модифицированного малоугловых диффузионных приближений (обозначены на рисунках как СМДП и ММДП соответственно). При моделировании было использовано 250 млн. фотонов. После генерации начального положения и направления распространения фотона, выполненной в соответствии с изложенной выше процедурой, дальнейшее движение фотона в рассеивающей среде моделировалось с помощью стандартных алгоритмов [21, 23]. Изменение направления фо-

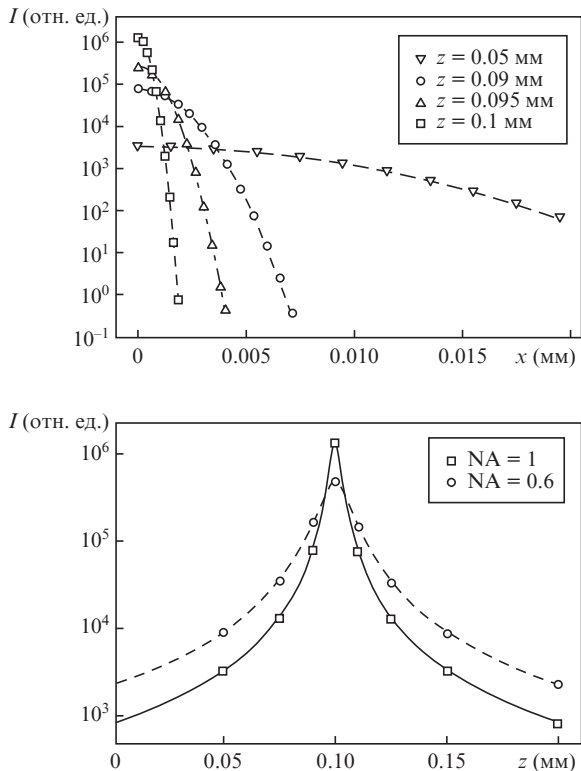


Рис.2. Поперечные профили интенсивности на различных глубинах  $z$  (а) и продольные осевые профили интенсивности для различных значений числовой апертуры объектива NA (б) гауссова пучка, сфокусированного в нерассеивающей среде на глубине  $z_f = 0.1$  мм, при  $\lambda_{ex} = 800$  нм. Кривые – формула (2), точки – результат МК-моделирования с помощью квазилучевого подхода.

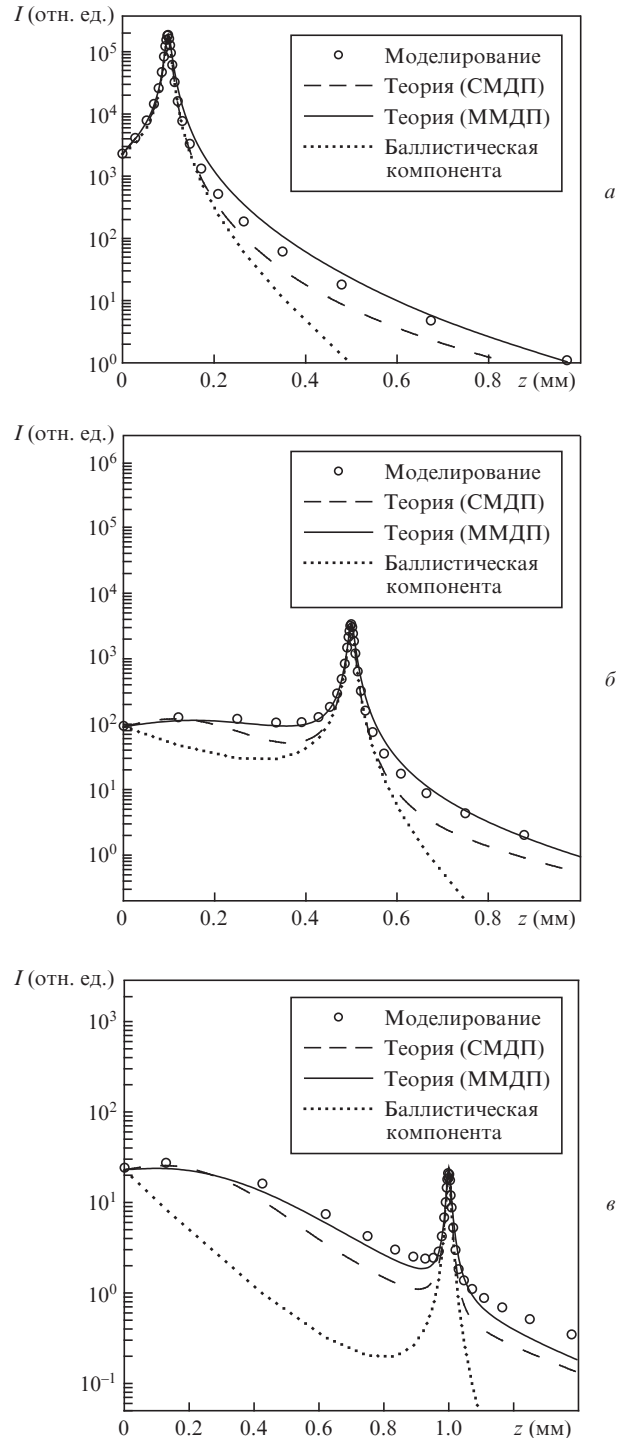


Рис.3. Аксиальные профили интенсивности в гауссовом пучке, сфокусированном в рассеивающей непоглощающей среде с показателем преломления  $n = 1.33$ , коэффициентом рассеяния  $\mu_{ex} = 10$  мм<sup>-1</sup> и фактором анизотропии рассеяния  $g = 0.9$ , при NA = 1,  $\lambda_{ex} = 800$  нм и  $z_f = 100$  (а), 500 (б) и 1000 мкм (в).

тона при каждом рассеянии определялось в соответствии с фазовой функцией (8). Из графиков видно, что в интервале глубин от поверхности среды до фокальной перетяжки модифицированная теория лучше согласуется с результатами моделирования, нежели стандартное малоугловое диффузионное приближение, но за фокусом обе модели демонстрируют расхождение с численным счетом. Однако в пользу модифицированной теории говорит то, что она точнее описывает поперечный профиль интенсив-



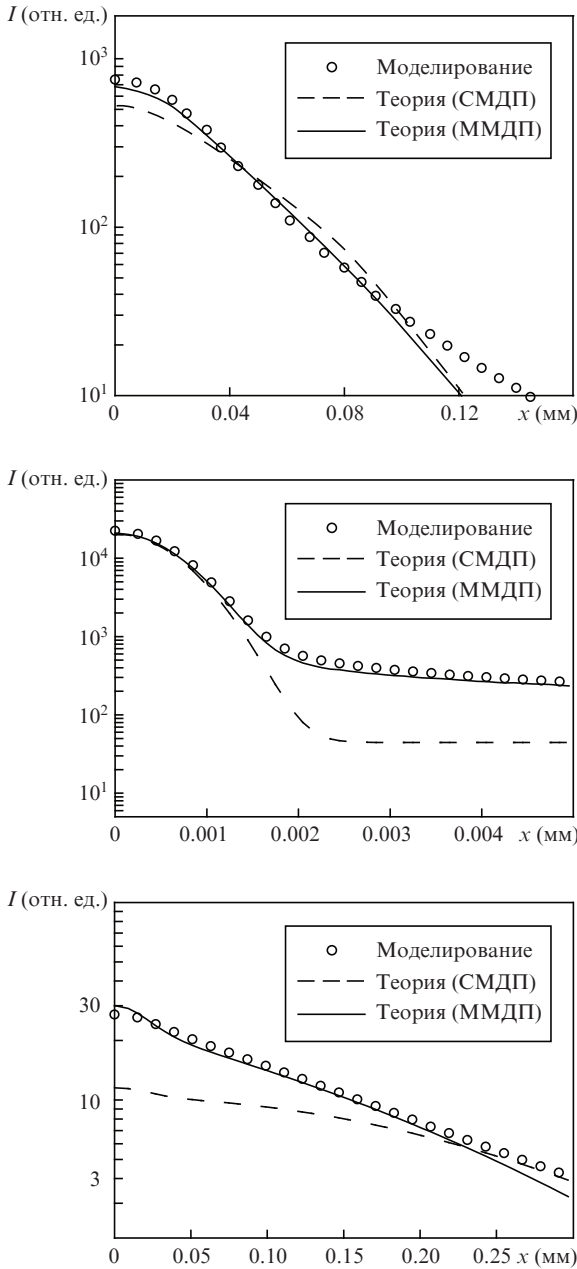


Рис.4. Поперечные профили интенсивности в гауссовом пучке ( $NA = 1, \lambda_{ex} = 800 \text{ nm}$ ), сфокусированном на глубине  $z_f = 500 \text{ мкм}$  в рассеивающей среде с  $n = 1.33, \mu_{ex} = 10 \text{ мм}^{-1}$  и  $g = 0.9$ . Профили рассчитаны в плоскостях  $z = 250$  (а),  $500$  (б) и  $750 \text{ мкм}$  (в).

ности, тогда как модель СМДП дает заниженные значения интенсивности вблизи оси пучка (рис.4а, в). В то же время на глубинах, превышающих 1 мм, рассчитанная аналитически интенсивность и для стандартного, и для модифицированного малоуглового приближения оказывается существенно ниже интенсивности, рассчитанной с помощью МК-моделирования (рис. 3, в). Это объясняется тем фактом, что на глубинах свыше одной транспортной длины  $l_t = [\mu_{ex}(1 - g)]^{-1}$  эволюция формы пучка определяется не малоугловым, а диффузным рассеянием, которого ни СМДП, ни ММДП не учитывает. Для выбранных параметров среды транспортная длина составляет как раз 1 мм. Отметим также, что во всем интервале рассмотренных глубин интенсивность в фокусе пучка определяется в основном баллистическими фотонами (см. рис.3). Однако когда глубина фокусировки приближается к одной транспортной длине,

полная интенсивность вблизи поверхности среды становится сравнимой с интенсивностью в перетяжке (рис.3, в), что создает помеху при наблюдении глубоко расположенных слоев. В целом можно заключить, что в областях среды, значимо участвующих в формировании сигнала ДВФ, модель на основе ММДП лучше согласуется с результатами МК-моделирования и потому является предпочтительной для дальнейшего применения.

**2.4. Распределение сигнала ДВФ в объемно-флуоресцирующей среде**

На основе разработанной модели пучка можно проанализировать, какие области сильно-рассеивающей и флуоресцирующей среды дают основной вклад в сигнал ДВФ, если флуоресцирующее вещество распределено в среде однородно. Это соответствует задачам наблюдения толстых образцов биоткани, когда флуорофор накапливается в ткани объемно. При этом мощность ДВФ  $Q = Q(z_f)$  является функцией глубины наблюдения, определяемой по положению фокуса пучка накачки в среде. В работах [4, 5, 25] показано, что в объемно-флуоресцирующей среде становятся существенными помехи полезному сигналу, создаваемые приповерхностным свечением. Для исследования данного эффекта мы рассмотрим аксиальное распределение мощности ДВФ  $W(z, z_f)$ , которое может быть вычислено путем интегрирования плотности источников флуоресценции  $q(r)$  по поперечной координате:

$$W(z, z_f) = \int_S q(r) d^2 r_{\perp} = \frac{\alpha \Sigma_2^* P_{ex}^2}{2\tau F} C_0 \int_S I_{ex}^2(r_{\perp}, z, z_f) d^2 r_{\perp}. \quad (10)$$

Для количественного анализа величин  $Q$  и  $W$  интенсивность  $I_{ex}(r_{\perp}, z, z_f)$  в пучке накачки будем рассчитывать по формулам ММДП (3), (6). На рис.5 представлена зависимость мощности ДВФ  $Q(z_f)$  от глубины фокусировки в рассеивающей среде, а на рис.6 приведены профили аксиального распределения мощности флуоресценции  $W(z, z_f)$ , соответствующие различным положениям фокуса пучка. Если допустить, что флуоресценция в среде возникает только благодаря нелинейному возбуждению флуорофора в окрестности фокуса нерассеянным светом, то, согласно закону Ламберта-Бера, функция  $Q(z_f)$  должна спадать с глубиной как  $\exp(-2\mu_{ex}z_f)$ , что соответствует ослаблению квадрата интенсивности  $I_b$  в фокусе. Однако поведение кривой на рис.5 отличается от описанного закона: вблизи поверхности затухание близко к экспоненциальному, но

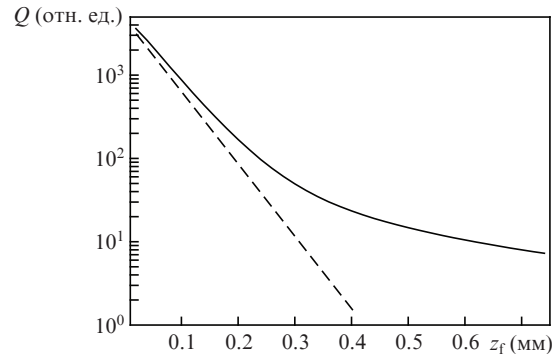


Рис.5. Мощность ДВФ как функция глубины фокусировки пучка накачки ( $NA = 1, \lambda_{ex} = 800 \text{ nm}$ ) в рассеивающей среде с  $n = 1.33, \mu_{ex} = 10 \text{ мм}^{-1}, g = 0.9$  (сплошная кривая); штриховая линия – экспоненциальная асимптота  $\exp(-2\mu_{ex}z_f)$ .

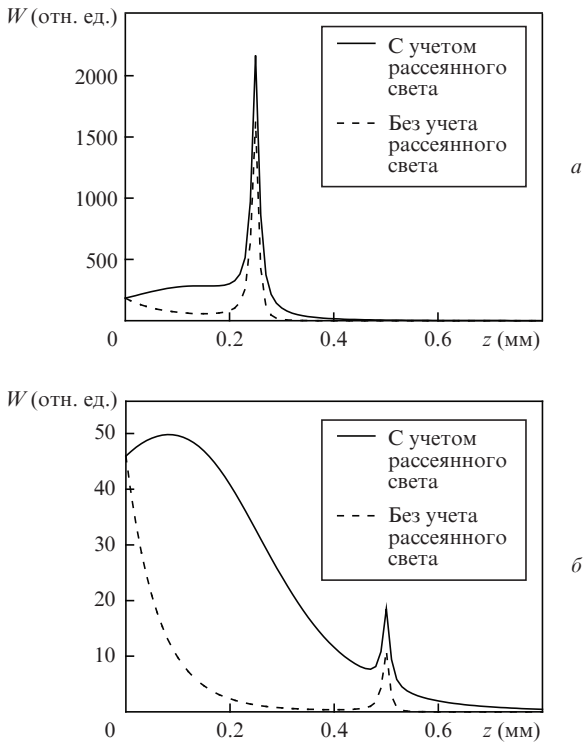


Рис.6. Аксиальная функция распределения мощности ДВФ  $W$  для различных глубин фокусировки пучка накачки ( $NA = 1, \lambda_{ex} = 800$  нм) в рассеивающей среде с  $n = 1.33, \mu_{ex} = 10$  мм<sup>-1</sup>,  $g = 0.9$  при  $z_f = 250$  (а) и 500 мкм (б).

характеризуется несколько меньшим показателем, а начиная с некоторой глубины скорость спадания сигнала существенно замедляется. Сопоставляя кривые на рис.5 и 6, можно убедиться, что первое отличие связано с влиянием рассеянного света на величину интенсивности в фокусе, а второе – с появлением мощного сигнала ДВФ вблизи границы, который становится сравнимым с сигналом из области фокуса, а затем начинает превышать его. Локальные значения мощности приповерхностной ДВФ невелики, однако область, формирующая этот сигнал, значительно больше области фокального объема. Снизить влияние приповерхностной засветки можно путем ограничения диафрагмы детектора, как это предусмотрено в схемах с ДСКД-приемником, но при отсутствии такой диафрагмы (например, в установках, оснащенных НДС-приемником) глубина

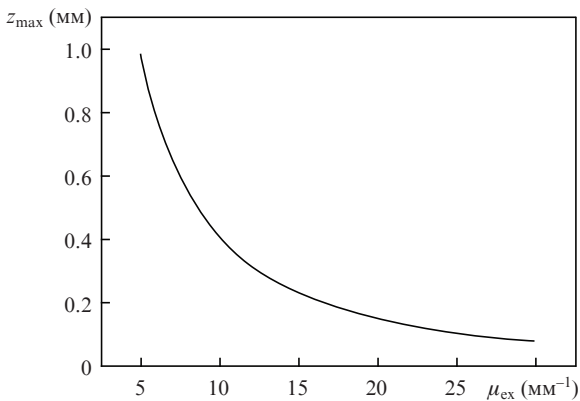


Рис.7. Предельная глубина  $z_{max}$  визуализации структуры рассеивающей и объемно-флуоресцирующей среды методом ДФМ, ограниченная приповерхностной засветкой, при  $NA = 1, \lambda_{ex} = 800$  нм,  $g = 0.9$  и  $n = 1.33$ .

визуализации методом ДФМ с высоким контрастом оказывается ограниченной (рис.7).

### 3. Оценка собирающей способности установок лазерной сканирующей микроскопии, оснащенных НДС- и ДСКД-детекторами, в условиях рассеяния

#### 3.1. Аналитический и численный расчеты собирающей способности систем ДФМ

Изображение, формируемое системами ДФМ, характеризуется мощностью флуоресценции, которая зарегистрирована из среды при заданном положении фокуса  $r_f = (r_{f\perp}, z_f)$  [15]:

$$P_{2PM}(r_f) = \int A(r_{\perp}, s) d^2 r_{\perp} ds \int q(r', r_f) L_0(r_{\perp} - r', s) s_z dr' \quad (11)$$

Здесь функция  $L_0(r_{\perp} - r', s)$  описывает пространственно-угловое распределение излучения флуоресценции в плоскости границы среды в точке  $r_{\perp}$  и в направлении  $s$  от изотропного источника единичной мощности, находящегося в среде в точке  $r'$ ;  $A(r_{\perp}, s)$  – пространственно-угловая характеристика приемника. Формула (11) учитывает, что апертура приемника, освещаемая излучением флуоресценции, ориентирована параллельно границе среды и имеет внешнюю нормаль в направлении оси  $z$ . Для точечного флуорофора, расположенного в фокусе,  $q(r', r_f) = Q\delta(r' - r_f)$ , а формула (11) принимает следующий вид:

$$P_{2PM}(r_f) = Q \int A(r_{\perp}, s) L_0(r_{\perp} - r_f, s) s_z d^2 r_{\perp} ds \quad (12)$$

Выражение, стоящее под интегралом в (12), есть собирающая способность системы регистрации ДФМ-изображения, которая представляет собой отношение числа фотонов флуоресценции, достигших фотодетектора, к числу фотонов, образовавшихся во флуоресцирующей среде в результате двухфотонного поглощения:

$$\eta(r_f) = \int A(r_{\perp}, s) L_0(r_{\perp} - r_f, s) s_z d^2 r_{\perp} ds \quad (13)$$

В условиях рассеяния собирающая способность зависит не только от характеристик приемника, но и от оптических параметров среды на длине волны флуоресценции.

Воспользуемся разработанной в предыдущем разделе моделью рассеяния для количественной оценки собирающей способности двух типов регистрирующих систем: с широкой приемной диафрагмой (соответствует ДФМ-системе, оснащенной НДС-приемником) и с ограниченной приемной диафрагмой (соответствует ДФМ-системе с ДСКД-приемником). Полагаем, что генерация фотонов флуоресценции за счет двухфотонного поглощения происходит преимущественно из области фокального объема, который при острой фокусировке не превышает нескольких кубических микрометров, и для упрощения окончательных формул источник флуоресценции может считаться точечным. В рассеивающей среде это предположение справедливо для глубин, соответствующих рабочему интервалу метода ДФМ, т.е. когда флуоресценция из перетяжки пучка существенно превышает сигнал объемной флуоресценции из приповерхностной области. Для среды с известным показателем рассеяния  $\mu_{ex}$  предельная глубина фокусировки, удовлетворяющая данному условию, мо-

жет быть определена по зависимости на рис.7. Для больших глубин расчет собирающей способности должен проводиться исходя из общего выражения (11) с учетом нелокального распределения источников ДВФ.

В рамках стандартного малоуглового диффузионного приближения функция  $L_0$  в среде на расстоянии  $r$  от точечного изотропного источника описывается выражением [26]

$$L_0(r, \varphi) = \frac{1}{4\pi r^2} \left[ \exp(-\mu_{em} r) \frac{\delta(\varphi)}{2\pi \sin \varphi} + \frac{1 - \exp(-\mu_{em} r)}{\pi D} \exp\left(-\frac{\varphi^2}{D}\right) \right], \quad (14)$$

где  $\varphi$  – угол отклонения вектора  $s$  от радиального направления;  $\mu_{em}$  – показатель рассеяния на длине волны эмиссии флуоресценции  $\lambda_{em}$ ;  $D = \mu_{em} \langle \gamma^2 \rangle r / 3$  – угловая дисперсия рассеянной составляющей яркости. Будем характеризовать систему регистрации оптического сигнала двумя параметрами: углом раскрытия  $\theta_{NA}$  числовой апертуры объектива (в системах ДФМ возбуждение и измерение флуоресценции производятся одним и тем же объективом) и величиной  $a_c$ , равной радиусу оптического изображения конфокальной диафрагмы детектора в фокальной плоскости объектива (рис.8). Величина  $a_c$  связана с физическим радиусом диафрагмы детектора  $R$  через параметры оптического увеличения объектива ( $M_o$ ) и микроскопа ( $M_m$ ):  $a_c = R / (M_o M_m)$  [27]. Кроме перечисленных параметров, собирающая способность реальной системы зависит от характеристик пропускания объектива и других оптических элементов, но эта зависимость может быть легко учтена домножением на соответствующие коэффициенты. В свою очередь, зависимость  $\eta$  от  $a_c$  будет более сложной, поскольку в конфокальной схеме регистрации величина  $a_c$  ограничивает область угловой чувствительности [11]. Формально влияние конфокальной диафрагмы можно описать наличием углового фильтра выходящего из среды излучения с характеристикой пропускания

$$T \cong \exp\left(-\frac{\varphi^2 r^2}{a_c^2 \cos^2 \theta}\right),$$

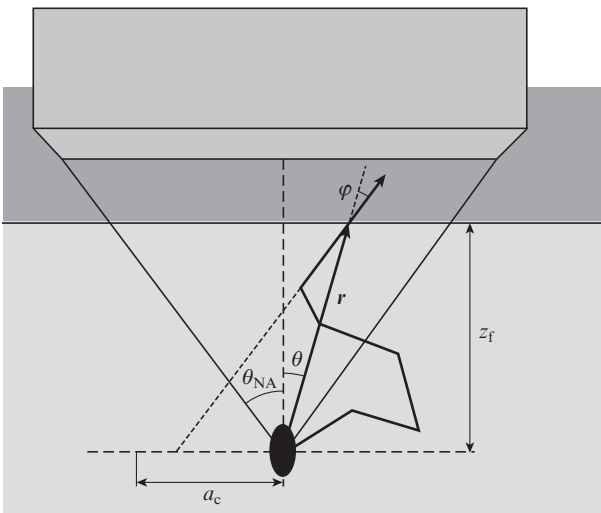


Рис.8. Схема регистрации флуоресцентного сигнала в установках с ограниченной конфокальной диафрагмой.

где  $\theta$  – угол между осью симметрии и направлением на точку вылета фотона из рассеивающей среды (рис.8). Недесканирующий детектор не содержит ограничивающей диафрагмы и позволяет принять все фотоны, попавшие в пределы числовой апертуры объектива. Поэтому в случае НДС-приемника величина  $a_c$  выбирается неограниченно большой. Таким путем снимается ограничение на направления прихода фотонов, участвующих в формировании сигнала флуоресценции из рассеивающей среды.

Апертура объектива пространственно ограничивает площадь, с которой регистрируется поток флуоресценции, кругом с внешним радиусом  $r_{\perp}^* = z_f \cos \theta_{NA}$ . Таким образом, пространственно-угловая характеристика приемника  $A$  может быть представлена в следующем виде:

$$A(r_{\perp}, \theta, \varphi) = \exp\left(-\frac{\varphi^2 r_{\perp}^2}{a_c^2 \cos^2 \theta \sin^2 \theta}\right) \Phi(z_f \cos \theta_{NA} - r_{\perp}), \quad (15)$$

где  $\Phi(\cdot)$  – функция Хевисайда, а собирающая способность выражается формулой

$$\eta(z_f) = \frac{1}{2} \int_{\cos \theta_{NA}}^1 \left[ \exp(-\mu_{em} z_f / x) + (1 - \exp(-\mu_{em} z_f / x)) \times \frac{a_c^2 x^2}{\mu_{em} \langle \gamma^2 \rangle z_f^3 / 3 x^3 + a_c^2 x^2} \right] dx. \quad (16)$$

Это выражение основано на расчете яркости с помощью стандартного малоуглового диффузионного приближения. Однако проведенное выше сравнение модели малоуглового диффузионного приближения с МК-моделированием показало, что теория дает заниженные значения локальной интенсивности вблизи оси симметрии системы. В данном случае это приведет к занижению собирающей способности системы формирования изображения. Поэтому мы уточнили выражение (15) по аналогии с формулой (6), учтя распределенность источника рассеянных фотонов при стандартном малоугловом диффузионном приближении:

$$\eta^*(z_f) = \frac{1}{2} \int_{\cos \theta_{NA}}^1 \left[ \exp(-\mu_{em} z_f / x) + a_c^2 x^2 \times \int_0^{z_f/x} \frac{\mu_{em} \exp(-\mu_{em} z_1)}{\mu_{em} \langle \gamma^2 \rangle (z_f/x - z_1)^3 / 3 + a_c^2 x^2} dz_1 \right] dx. \quad (17)$$

Для нерассеивающей среды из (16) и (17) может быть получен очевидный результат:  $\eta_0 = (1 - \cos \theta_{NA}) / 2$ . Для сред, обладающих рассеянием, результаты расчета собирающей способности систем, оснащенных НДС- и ДСКД-приемниками, и данные МК-моделирования представлены на рис.9. Численное моделирование основывалось на расчете транспорта фотонов, генерируемых точечным изотропным источником в фокусе пучка накачки, к границе рассеивающей среды с показателем рассеяния  $\mu_{em}$  и фазовой функцией рассеяния (8), и на пространственно-угловой фильтрации выходящих фотонов в соответствии с условием (15). С целью удобства расчетов величина  $a_c$  приводится в единицах радиуса диска Эйри (д.Э.) для заданной  $\lambda_{em}$  и числовой апертуры объектива. Диафрагма приемника, открывающая в фокальной плоскости объектива один диск Эйри ( $1 \text{ д.Э.} = 0.61 \lambda_{em} / NA$ ), обеспечивает идеально конфокальное детектирование сигнала флуоресценции; для

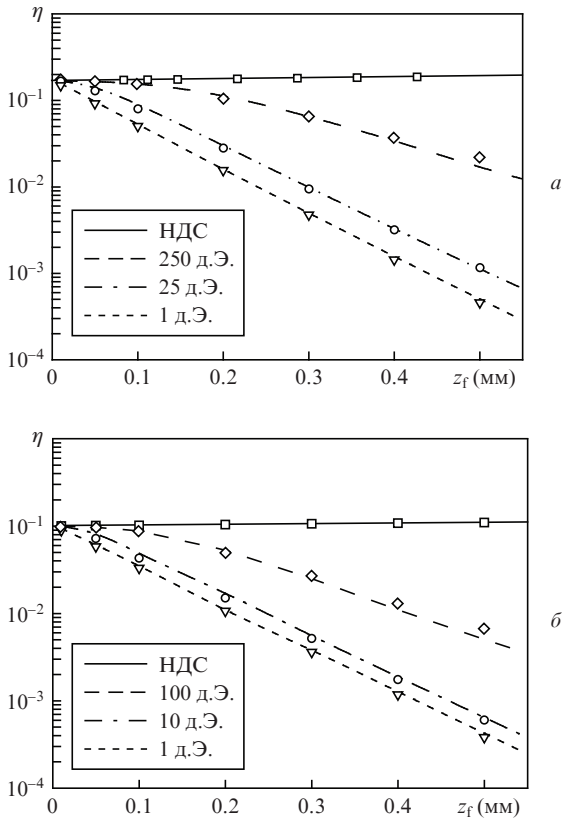


Рис.9. Собирающая способность системы ДФМ в рассеивающей среде ( $\mu_{em} = 10 \text{ мм}^{-1}$ ,  $g = 0.9$ ,  $n = 1.33$ ) как функция глубины фокусировки для разных значений  $a_c$ , измеряемых в единицах радиуса диска Эйри (д.Э.), при  $\lambda_{em} = 500 \text{ нм}$ ,  $NA = 1$  (а) и  $0.8$  (б). Линии соответствуют теоретическому расчету, точки – данным МК-моделирования для тех же значений  $a_c$ .

системы с НДС-приемником  $a_c \rightarrow \infty$  (обозначено на рисунке как «НДС»).

Сопоставление результатов аналитического расчета собирающей способности с данными МК-моделирования подтверждает корректность разработанной модели (17) в рассмотренной области глубин расположения малого флуоресцирующего объекта. В целом приведенные зависимости показывают, что ограничение области детектирования конфокальной диафрагмой существенно влияет на величину  $\eta^*$ . Собирающая способность идеально конфокальной диафрагмы ( $a_c = 1$  д.Э.) ослабляется с глубиной экспоненциально, однако увеличение диафрагмы в 10 и даже в 25 раз существенно не меняет скорость уменьшения  $\eta^*(z_f)$ , которая снижается только при диафрагмах с  $a_c > 100$  д.Э. При этом даже для диафрагмы таких размеров собирающая способность оказывается значительно ниже  $\eta_0$ , если флуорофор расположен на глубине, превышающей несколько длин рассеяния,  $l_{em} = 1/\mu_{em}$ .

Количественные оценки влияния рассеяния на собирающую способность системы ДФМ выполним для установки Carl Zeiss LSM 510. Максимальный физический размер приемной диафрагмы в такой установке ( $2R = 1000 \text{ мкм}$ ) соответствует в фокальной плоскости объектива области диаметром  $2a_c = (300/M_0) \text{ мкм}$ . Для стандартного водно-иммерсионного объектива  $20\times/1.0$  ( $M_0 = 20$ ,  $NA = 1$ ) поперечный размер области чувствительности системы детектирования равен  $15 \text{ мкм}$ , что для  $\lambda_{em} = 500 \text{ нм}$  соответствует  $a_c = 25$  д.Э. При такой области чувствительности собирающая способность системы ДФМ с глубин, пре-

вышающих одну длину рассеяния, близка к таковой для конфокальной схемы детектирования и спадает с глубиной приблизительно по закону  $\exp(-\mu_{em} z_f)$  (рис.9,а).

### 3.2. Влияние собирающей способности на сигнал ДФМ

Ослабление собирающей способности с увеличением глубины фокусировки в рассеивающей среде будет сказываться на скорости спада сигнала ДФМ. Яркость каждого пикселя ДФМ-изображения определяется числом фотонов флуоресценции  $N(z_f)$ , приходящих на приемник за характерное время накопления сигнала  $\Delta t$ :

$$N(z_f) = P_{2PM}(z_f) \Delta t \cong Q(z_f) \eta(z_f) \Delta t.$$

Данное соотношение применимо в ситуации, когда двухфотонное возбуждение флуорофора сосредоточено в окрестности фокуса и эффектами приповерхностной засветки можно пренебречь. На рис.10 продемонстрирована зависимость сигнала ДФМ, регистрируемого из рассеивающей среды системами, оснащенными НДС- либо ДСКД-приемником, от глубины фокусировки. Очевидно, что скорость спада сигнала в системах с НДС-приемником значительно ниже, чем в системах с приемной диафрагмой, размер которой совпадает с диаметром диска Эйри (идеально конфокальное детектирование). Однако увеличение размера конфокальной приемной диафрагмы до 10–20 д.Э. практически не сказывается на изменении скорости спада ДФМ-сигнала. Таким образом, в системах лазерной сканирующей микроскопии, оснащенных ДСКД-приемником, изменение размера диафрагмы детектора в допустимых на практике пределах не приводит к существенному увеличению уровня ДФМ-сигнала, достигаемому в системах с НДС-детектором. В первом приближении зависимость сигнала ДФМ от глубины может оцениваться для систем с НДС-приемником как  $N_{NDS}(z_f) \sim \exp(-2\mu_{ex} z_f)$ . Сигнал ДФМ в системах с регулируемой конфокальной диафрагмой с учетом вышесказанного спадает как  $N_{DSCD}(z_f) \sim \exp[-(2\mu_{ex} - \mu_{em})z_f]$ . Для большинства биотканей показатель рассеяния  $\mu_s$  либо практически не зависит от длины волны в диапазоне 500–1000 нм [20], либо уменьшается по закону, близкому к степенному:  $\mu_s \sim \lambda^{-m}$ , где  $m = 0.5-2$  [28]. Для накачки в ближнем ИК диапазоне и флуоресценции в видимой области спектра коэффициенты рассеяния соотносятся приблизительно как  $\mu_{em}/\mu_{ex} \sim 1-2$ .

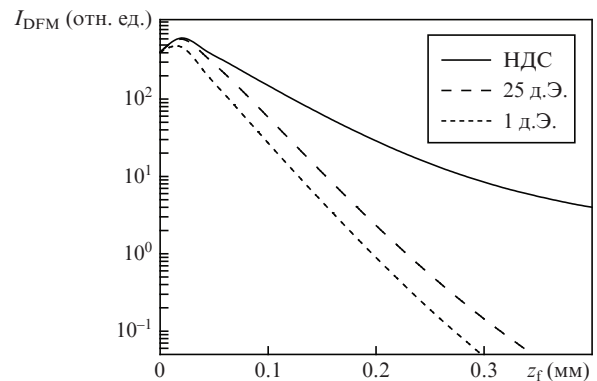


Рис.10. Сигнал ДФМ в зависимости от глубины фокусировки в рассеивающей среде, зарегистрированный с помощью НДС-приемника (сплошная линия) и ДСКД-приемника (прерывистые линии) с указанными размерами диафрагмы при  $\mu_{ex} = 10 \text{ мм}^{-1}$ ,  $\mu_{em} = 15 \text{ мм}^{-1}$ ,  $g = 0.9$ ,  $n = 1.33$ ,  $M_0 = 20$  и  $NA = 1$ .



Отсюда следует, что полный показатель ослабления сигнала ДФМ, регистрируемого приемником с ограниченной диафрагмой, составляет  $2\mu_{ex} + \mu_{em} = (3-4)\mu_{ex}$  и оказывается в 1.5–2 раза выше показателя ослабления сигнала ДФМ, регистрируемого НДС-детектором.

#### 4. Заключение

Анализ влияния рассеяния на характеристики изображения оптически толстых образцов биоткани, сформированного методом двухфотонной флуоресцентной микроскопии, требует тщательного выбора теоретической модели. В настоящей работе путем сопоставления с результатами МК-моделирования продемонстрирована эффективность модифицированного малоуглового диффузионного приближения. Этот теоретический подход был использован для исследования особенностей двухфотонного возбуждения флуоресценции в сильнорассеивающем образце, а также для анализа собирающей способности ДФМ-системы. Полученные результаты позволяют в условиях рассеяния прогнозировать характер ослабления сигнала флуоресценции в установках ДФМ, оснащенных различными типами детекторов.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» (проекты № 02.740.11.0086, 02.740.11.0566, 02.740.11.0839, 14.740.11.0253), РФФИ (грант № 08-02-01293) и грантов Президента Российской Федерации для поддержки молодых кандидатов наук (№ МК-698.2009.2, МК-1127.2010.2).

- Helmchen F., Denk W. *Nature Meth.*, **2**, 932 (2005).
- Zipfel W.R., Williams R.M., Webb W.W. *Nature Biotechnol.*, **21**, 1368 (2003).
- So P.T.C., Dong C.Y., Masters B.R., Berland K.M. *Ann. Rev. Biomed. Eng.*, **2**, 399 (2000).
- Theer P., Denk W. *J. Opt. Soc. Am. A*, **23**, 3139 (2006).
- Сергеева Е.А. *Квантовая электроника*, **40**, 411 (2010).
- Larson D.R., Zipfel W.R., Williams R.M., Clark S.W., Bruchez M.P., Wise F.W., Webb W.W. *Science*, **300**, 1434 (2003).
- Centonze V.E., White J.G. *Biophys. J.*, **75**, 2015 (1998).
- Denk W., Piston D.W., Webb W.W., in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Ed. by J.B.Pawley (New York: Springer Science+ Business Media, LLC, 2006, p. 535).
- Nimmerjahn A., Theer P., Helmchen F., in *Ultrashort Laser Pulses in Biology and Medicine*. Ed. by M.Braun, P.Gilch, W.Zint (Berlin: Springer, 2008, p. 29).
- Dunn A.K., Wallace V.P., Coleno M., Berns M.W., Tromberg B.J. *Appl. Opt.*, **39**, 1194 (2000).
- Leray A., Odin C., Le Grand Y. *Opt. Commun.*, **281**, 6139 (2008).
- Beaurepaire E., Mertz J. *Appl. Opt.*, **41**, 5376 (2002).
- Xu C., Webb W.W. *J. Opt. Soc. Am. B*, **13**, 481 (1996).
- Исимару А., *Распространение и рассеяние волн в случайно-неоднородных средах* (М.: Мир, 1981, т.1).
- Зеге Э.П., Иванов А.П., Кацев И.Л. *Перенос изображения в рассеивающей среде* (Минск: Наука и техника, 1985).
- Долин Л.С. *Изв. АН СССР. Сер. Физика атмосферы и океана*, **26**, 300 (1983).
- Tuchin V.V. *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis* (Bellingham, WA: SPIE Press, 2007).
- Sharma S.K., Banerjee S. *J. Opt. A: Pure Appl. Opt.*, **5**, 294 (2003).
- Marchesini R., Bertoni A., Andreola S., Melloni E., Sichirollo A.E. *Appl. Opt.*, **28**, 2318 (1989).
- Van der Zee P. *Measurement and Modelling of The Optical Properties of Human Tissue in The Near Infrared*. Ph.D. Thesis (University College London, 1992).
- Gan X., Gu M. *Appl. Opt.*, **39**, 1575 (2000).
- Leray A., Odin C., Huguet E., Amblard F., Le Grand Y. *Opt. Commun.*, **272**, 269 (2007).
- Wang L., Jacques S.L., Zheng L. *Comp. Meth. Progr. Biomed.*, **47**, 131 (1995).
- Milsom P.K. *Appl. Phys. B: Lasers and Optics*, **70**, 593 (2000).
- Ying J., Liu F., Alfano R.R. *Appl. Opt.*, **38**, 224 (1999).
- Долин Л.С. *Изв. АН СССР. Сер. Физика атмосферы и океана*, **18**, 840 (1982).
- Pawley J.B., in *Handbook of Biological Confocal Microscopy*. Ed. by J.B.Pawley (New York: Springer Science+Business Media, LLC, 2006, p. 20).
- Simpson C.R., Kohl M., Essenpreis M., Cope M. *Phys. Med. Biol.*, **43**, 2465 (1998).